

Quantitative Bestimmung von Serumproteinen durch radiale Immundiffusion

Von K. SCHUMACHER und M. KESSLER

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Köln (Direktor: Prof. Dr. R. Gross)

(Eingegangen am 9. Oktober 1967)

Es wird über Untersuchungen zur quantitativen Bestimmung verschiedener Serumproteine durch spezifische radiale Immundiffusion im Agargel berichtet. Aufgrund der Meßergebnisse werden die Spezifität, die Genauigkeit und die Reproduzierbarkeit der Methode besprochen. In 50 Blutspendenserum wurden die Immunglobuline IgG, IgA, IgM sowie Transferrin und Coeruloplasmin quantitativ bestimmt und die erhaltenen Mittelwerte mit den aus der Literatur entnommenen, teilweise mit anderer Technik gefundenen Daten verglichen. Die Fehlermöglichkeiten der Methode werden diskutiert.

Studies are reported on the quantitative determination of various serum proteins by specific radial immunodiffusion in agar gel. The specificity, accuracy and reproducibility of the method is discussed on the basis of the experimental data. The immunoglobulins IgG, IgA, IgM, and transferrin and coeruloplasmin were measured in the sera from 50 blood donors; the average values were compared with those from other laboratories. Possible sources of error in the method are discussed.

Die Aufklärung der Funktion zahlreicher Proteine in Körperflüssigkeiten, vor allem im Serum, hat es möglich gemacht, allein aus dem quantitativen Verhalten einzelner Proteine wichtige Hinweise für Diagnose und Pathogenese mancher Erkrankungen zu gewinnen. Einfache und dennoch genaue Methoden zur quantitativen Bestimmung einzelner Proteine werden deshalb für die Klinik zunehmende Bedeutung erlangen.

Zur Trennung und quantitativen biochemischen Bestimmung einzelner Proteine in Eiweißgemischen, wie sie Körperflüssigkeiten darstellen, nutzt man die Unterschiede der Proteine bezüglich Größe, Molekulargewicht, Ladung und Verhalten in verschiedenen Lösungsmitteln aus. Verfahren, die auf diesen Prinzipien beruhen, wie Molekularsiebung, Ultrazentrifugation, Ionenaustauschchromatographie, Elektrophorese und Fällungsreaktion, bleiben auf spezielle Fragestellungen beschränkt. Zahlreiche Proteine lassen sich quantitativ durch Bestimmung ihrer biologischen Funktion, z. B. Enzymaktivität, Transportfunktion, Antikörperaktivität erfassen (1–5).

Eine auf alle Eiweißkörper nach einheitlichem Prinzip anwendbare Methode ist die quantitative Bestimmung von Proteinen aufgrund ihrer spezifischen Antigen determinanten. Verschiedene Modifikationen dieses Prinzips, das auf der quantitativen Fällung eines Antigens durch seinen spezifischen Antikörper mit Ausbildung eines unlöslichen Antigen-Antikörper-Komplexes beruht, wurden in den letzten 35 Jahren entwickelt. Bereits 1931 führten HEIDELBERGER und KENDALL (6) eine quantitative Proteinbestimmung durch Immunpräzipitation ein, bei der die Antigenkonzentration aus dem Proteinstickstoffgehalt des Präzipitates berechnet wird. Dieses Verfahren ist genau, aber relativ umständlich. Die nephelometrische Bestimmung der Immunpräzipitate durch GOODMAN und Mitarbeiter (7), HOIGNÉ und Mitarbeiter (8) sowie SCHULTZE und SCHWICK (9) ergab eine wesentliche Vereinfachung dieser Methode bei fast gleicher Genauigkeit.

Läßt man die Reaktion in einem durchsichtigen Gelmilieu, z. B. Agargel, ablaufen, dann werden die Immunpräzipitate direkt als Trübung sichtbar. Da bei der Diffusion lineare Konzentrationsgradienten der Reaktionspartner entstehen und Immunpräzipitate im Äquivalenzbereich von Antigen und Antikörper am stärksten ausgeprägt sind, lassen sich die Diffusionsstrecke oder -fläche als Parameter der Antigenkonzentration verwenden. Bei der einfachen Immundiffusion diffundiert nur das Antigen, während der Antikörper gleichmäßig im Agargel verteilt ist. Die 1947 von OUDIN (10) eingeführte einfache, eindimensionale Immundiffusion wurde von FEINBERG (11) zur einfachen, zweidimensionalen Immundiffusion ausgebaut. HAYWARD und AUGUSTIN (12) sowie MANCINI und Mitarbeiter (13) wandelten diese Technik zur einfachen radialen Immundiffusion ab. Die von OUCHTERLONY (14) inaugurierte Doppeldiffusionstechnik, bei der beide Reaktionspartner gegeneinander diffundieren, wurde von HIRTZIG (15) durch Ansetzen

verschiedener Verdünnungen des Antigens für quantitative Bestimmungen adaptiert.

Mit Hilfe der verschiedenen immunologischen Methoden wurde durch Verwendung monospezifischer Antiseren eine Reihe von Serumproteinen quantitativ bestimmt und deren Vermehrung oder Verminderung in verschiedenen Altersklassen und bei Erkrankungen beschrieben (4, 15–26).

Da sich die quantitative Bestimmung von Proteinen durch einfache radiale Immundiffusion wegen ihrer einfachen Durchführung für klinische Untersuchungen besonders eignet, wurden von uns Spezifität, Reproduzierbarkeit und Fehlerbreite dieser Methode untersucht. Ferner wurden die Normalbereiche für die Immunglobuline IgG, IgA, IgM und für Transferrin und Coeruloplasmin in Seren von jungen, gesunden Erwachsenen ermittelt.

Methodik

3 ml/1proz. Reinagar (Behringwerke, Marburg) in 0,1M Na-Barbituratpuffer, pH 8,6 wurden bei 50° mit 0,3 ml eines spezifischen Antiserums (Behringwerke, Marburg) gemischt und auf einen Objektträger aufgetragen. In den erstarrten Agar wurden in Abständen von 20 mm Löcher von 1,5 mm Durchmesser gestanzt. Zum Vergleich wurden vorpräparierte antiserumhaltige Immundiffusionsplatten (Hyland Laboratories Los Angeles, Calif.) verwendet. Diese Platten waren mit spezifischen Antiseren (Ziege): Anti-IgG, Anti-IgA, Anti-IgM, Anti-Transferrin, Anti-Coeruloplasmin beschickt. Jedes Plättchen enthielt 6 Löcher mit einem Durchmesser von 2,35 mm.

In jeweils 3 Löcher eines Plättchens wurden 4 μ l (Mikroliterpipette) Antigenlösung unterschiedlicher, aber bekannter Konzentration (Referenzserum), in die drei weiteren Löcher entsprechend je 4 μ l Antigenlösung unbekannter Konzentration eingefüllt. Anschließend wurden die Plättchen 40 Stdn. bei 4° inkubiert.

Nach Diffusion der Antigene in den antiserumhaltigen Agar entstanden in der Äquivalenzzone Präzipitatringe. Die Durchmesser der Präzipitate wurden am Meßmikroskop (Leitz, Wetzlar) bestimmt.

Da bei gleichbleibender Diffusionszeit der Flächeninhalt eines Präzipitates dem Logarithmus der Antigenkonzentration proportional ist, läßt sich bei halblogarithmischem Auftrag aus Präzipitadurchmesser und Antigenkonzentration eine Eichkurve konstruieren. Die Konzentrationen der Referenzantigene müssen dabei so gewählt werden, daß sie mit den zugehörigen Präzipitadurchmessern eine Gerade ergeben. Durch Ablesen der Präzipitadurchmesser unbekannter Antigenkonzentration an der Eichgeraden ergibt sich die Konzentration der Proben.

Nach Elution der nicht präzipitierten Proteine mit 0,9proz. NaCl können die Präzipitate mit Proteinfarbstoffen gefärbt werden.

Ergebnisse

Nach Ansatz der Referenzseren in jeweils drei verschiedenen Konzentrationen ergaben sich nach Diffusion unter den genannten Bedingungen aus den am Meßmikroskop bestimmten Präzipitatdurchmessern bei halblogarithmischem Auftrag für jedes Protein charakteristische Eichgeraden (Abb. 1).

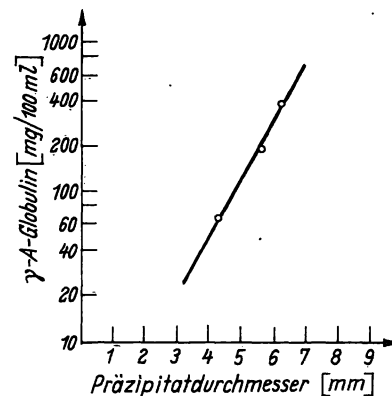
Die Verdünnungen der Referenzseren wurden bei allen Versuchsansätzen gleich gehalten.

Die Prüfung der Präzision der Methode durch wiederholten Ansatz der Standardproteinlösungen ergab bei der Auswertung von 65 Versuchen mit 975 Einzelbestimmungen eine sehr gute Übereinstimmung der gemittelten gefundenen mit den erwarteten Werten (Tab. 1). Es fand sich bei allen 5 Proteinen eine positive Korrelation zwischen den X- und Y-Werten. Die Werte der Korrelationskoeffizienten lagen zwischen 0,996 und 0,999 (Tab. 2). Die Daten der Regressionsgeraden und die Streuung der Werte um die Geraden gehen ebenfalls aus Tabelle 2 hervor.

Der exakte Verlauf der Eichkurven zur quantitativen immunologischen Bestimmung verschiedener Serumproteine wurde durch Ansatz unterschiedlicher Konzentrationen der Standardseren ermittelt (Abb. 2). Erwartungsgemäß zeigten die Eichkurven nur in einem mittleren Bereich einen annähernd linearen Verlauf. Nur dieser Bereich ist für die Proteinbestimmung un-

bekannter Proben verwertbar. Messungen außerhalb dieses Bereiches sind mit großen Fehlern behaftet. Seren, die infolge höherer oder niedrigerer Antigenkonzentration nach oben oder unten aus diesem Bereich herausfallen, müssen zuvor entsprechend verdünnt oder eingengt werden.

Abb. 1
Eichgerade zur quantitativen immunologischen Bestimmung von γ -A-Globulin. Ansatz der Referenzseren in jeweils drei Standardverdünnungen. Auswertung der Präzipitatdurchmesser mit dem Meßmikroskop



Tab. 1

Quantitative immunologische Bestimmung von Serumproteinen durch radiale Immundiffusion im Agargel. Bestimmung der Präzision der Methode durch wiederholten Ansatz (N = 65) von Standardproteinlösungen in jeweils drei Konzentrationen. Angaben in mg/100 ml. Die größte Variation fand sich bei der Bestimmung von γ -M-Globulin; es folgten mit absteigender Variationsbreite Coeruloplasmin, γ -A-Globulin, γ -G-Globulin und Transferrin

Antigen-Standard	Konzentration	arithmetisches Mittel gefundener Wert	arithmetisches Mittel erwarteter Wert	Standardabweichung (s)	Variationskoeffizient (VK)
IgG	I	1399	1409	$\pm 101,9$	7,3
	II	836	701	$\pm 60,6$	7,2
	III	234	234	$\pm 19,3$	8,2
IgA	I	373	394	$\pm 30,5$	8,2
	II	185	197	$\pm 19,7$	10,6
	III	62	66	$\pm 8,2$	13,2
IgM	I	92	98	$\pm 8,0$	8,7
	II	51	49	$\pm 6,4$	12,5
	III	22	16	$\pm 5,3$	24,0
Transferrin	I	429	459	$\pm 22,2$	5,2
	II	241,5	230	$\pm 16,2$	6,7
	III	69,6	77	$\pm 4,2$	6,0
Coeruloplasmin	I	4	46	$\pm 3,6$	8,2
	II	20,6	22	$\pm 2,05$	9,9
	III	8,45	8,0	$\pm 1,2$	14,2

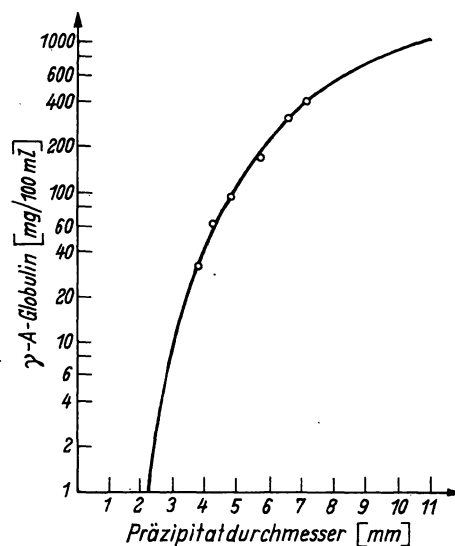


Abb. 2

Eichkurve zur quantitativen immunologischen Bestimmung von γ -A-Globulin. Ansatz der Referenzseren in mehreren Verdünnungsstufen. Die Auswertung der Präzipitatdurchmesser erfolgte mit dem Meßmikroskop

Tab. 2

Bestimmung der Regressionsgeraden, der Streuung der Werte um die Gerade und der Korrelationskoeffizienten bei wiederholtem Ansatz von Standardverdünnungen der Referenzseren

Antigen-Standard	Regressions-Geraden $Y = a + bX$	Streuung der Regressionsgeraden	Korrelationskoeffizient
		$Sy \cdot x = \sqrt{\frac{\Sigma(Y^2) - [a\Sigma(Y) + b\Sigma(XY)]}{N}}$	$r = \frac{N\Sigma XY - \Sigma X \Sigma Y}{\sqrt{[N\Sigma X^2 - (\Sigma X)^2][N\Sigma Y^2 - (\Sigma Y)^2]}}$
IgG	$61,5 + 0,975X$	$\pm 63,7$	0,999
IgA	$0,83 + 0,949X$	$\pm 20,4$	0,999
IgM	$8,83 + 0,855X$	$\pm 4,24$	0,999
Transferrin	$9,85 + 0,930X$	$\pm 3,82$	0,996
Coeruloplasmin	$0,30 + 0,948X$	$\pm 0,238$	0,999

Die hier gezeigten Eichkurven schneiden die Abszisse bei 2,3 mm. Infolge des Durchmessers der Antigenlöcher von 2,3 mm waren kleinere Präzipitate nicht meßbar.

Die Spezifität der quantitativen Proteinbestimmung durch radiale Immundiffusion wurde für das γ -G-Globulin durch Ansatz verschiedener Verdünnungsstufen eines chromatographisch und immunologisch reinen γ -G-Globulins ermittelt. Es ergab sich eine Eichkurve, die den mit standardisierten Vollseren gewonnenen Eichkurven für IgG entspricht (Abb. 3).

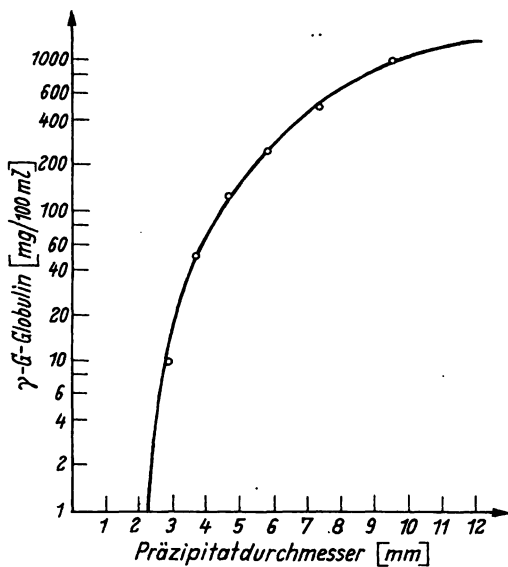


Abb. 3

Eichkurve, erhalten durch Bestimmung der Präzipitattendurchmesser nach Ansatz verschiedener Verdünnungen eines chromatographisch und immunologisch reinen γ -G-Globulins

Zur Ermittlung der Korrelation zwischen IgG-Bestimmung im Vollserum und in einer Lösung von isoliertem γ -G-Globulin wurden die nach Diffusion von reinem γ -G-Globulin erhaltenen Präzipitattendurchmesser auf die mit Standardserum gewonnene Eichkurve für γ -G-Globulin bezogen. Die danach ermittelten Werte für die einzelnen Verdünnungsstufen der γ -G-Globulinlösung zeigten zwar eine Abweichung von den erwarteten Werten, jedoch konnte eine positive Korrelation nachgewiesen werden (Abb. 4). Allerdings erwies sich die Korrelation zwischen den erwarteten

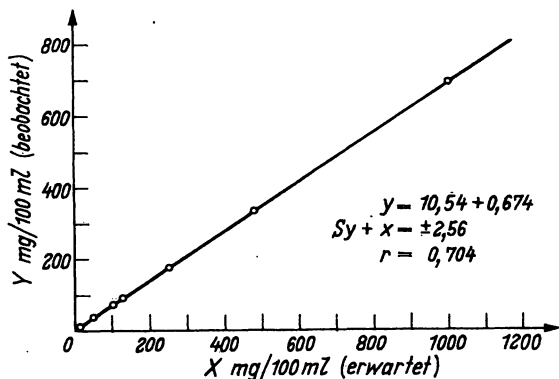


Abb. 4

Graphische Darstellung der Resultate der Richtigkeitsprüfung der Methode der quantitativen immunologischen Bestimmung von isoliertem γ -G-Globulin. Berechnung der Regressionsgeraden, der Streuung und des Korrelationskoeffizienten

und den gefundenen Werten ($r = 0,704$) als noch nicht signifikant ($0,1 > p > 0,05$).

In Seren von 50 gesunden Erwachsenen im Alter von 22–39 Jahren (Blutspender) wurden die Normalwerte und deren Standardabweichungen für die Serumproteine IgG, IgA, IgM, Transferrin und Coeruloplasmin bestimmt. Nach der graphischen Darstellung der Einzelwerte und der Bestimmung der kumulativen Häufigkeit ergab sich eine nicht ganz symmetrische Verteilung der Werte. Jedoch waren diese Abweichungen nicht erheblich, so daß das arithmetische Mittel als ausreichend repräsentativ für die tatsächlichen Mittelwerte angesehen werden kann. Die Mittelwerte und deren Standardabweichung sowie die Variationskoeffizienten sind in Tabelle 3 zusammengestellt, deren graphische Darstellung zeigt Abbildung 5.

Tab. 3

Normalwerte (mg/100 ml): Arithmetisches Mittel, Standardabweichung und Variationskoeffizienten der quantitativen immunologischen Bestimmung von Immunglobulinen sowie Transferrin und Coeruloplasmin in 50 Blutspenderseren

Antigen	arithmetisches Mittel \bar{x}	Standardabweichung (s)	Variationskoeffizient (VK)
IgG	1001	± 151	15
IgA	195	± 46	23
IgM	87,2	$\pm 20,5$	23,5
Transferrin	286	$\pm 39,6$	13,8
Coeruloplasmin	26,6	$\pm 5,08$	19,1

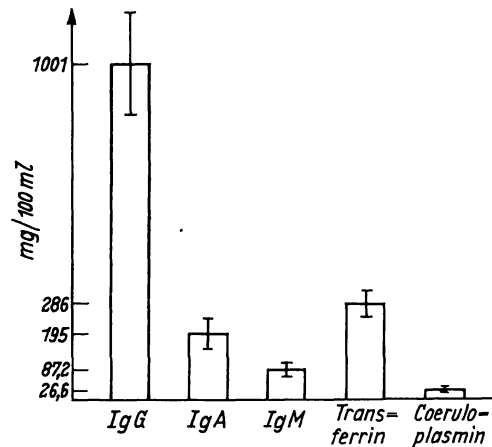


Abb. 5

Graphische Darstellung der Normalwerte (arithmetisches Mittel und Standardabweichung) der quantitativen immunologischen Bestimmung von Serumproteinen

Der Vergleich der von uns für 5 Serumproteine gefundenen Mittelwerte mit Ergebnissen anderer Autoren zeigt eine ausreichende Übereinstimmung der Befunde verschiedener Laboratorien, obwohl unterschiedliche Techniken verwendet wurden (Tab. 4).

Zur Feststellung der Beziehungen zwischen der quantitativen immunologischen Bestimmung einzelner Serumproteine und der in der Klinik üblichen papier-elektrophoretischen Gruppenanalyse der Serum-eiweiße wurden die Normalseren papier-elektrophoretisch untersucht. Vergleichbar sind bei den beiden Methoden nur die Werte der γ -Globuline und des Albumins, da alle anderen Elektrophoresefraktionen Mischfraktionen darstellen. Papier-elektrophoretisch fanden wir in Normalseren für die γ -Globulinfraktion einen Mittelwert von

Tab. 4

Vergleich der Ergebnisse (mg/100 ml) quantitativer Serumproteinbestimmungen aus verschiedenen Laboratorien. Die mit verschiedenen Techniken bestimmten Werte zeigen eine teilweise sehr gute Übereinstimmung. Die von WERDER-KIND an Säuglingen und die von HAFERKAMP und Mitarbeitern an alten Leuten erhobenen Befunde sind mit den übrigen Werten nur bedingt vergleichbar. ID = Immundiffusion, RID = radiale Immundiffusion

Autoren	IgG	Serumproteine mg/100 ml			Coeruloplasmin	Methode
		IgA	IgM	Transferrin		
MARKOWITZ 1955					34	LOUDIN
RAVIN 1956					19	enzymatisch
VELLA 1957					32	enzymatisch
FROHMAN 1958				265,5	35,9	nephelometrisch
SCHULTZE u. SCHWICK 1958	1480			400	30	nephelometrisch
SASS-KARTSAK 1959					34,5	enzymatisch
HITZIG 1961					31,7	LOUDIN-OUCHTERLONY
ROTH 1962		200	160			OUCHTERLONY
WERDER-KIND 1963	698				16	LOUDIN-OUCHTERLONY
HUNTLEY 1963	1410					lineare ID
FAHEY 1963	1263	394		116		Immunhemmtechnik
CLAMAN u. MERRILL 1964	1194	395		191		LOUDIN
WEISS 1965	1314		103	300	38	LOUDIN-OUCHTERLONY, nephelometrisch
McKELVEY u. FAHEY 1965	1240	280	120			RID
HAFERKAMP u. Mitarbeiter 1966	1610	510	210	310		RID
STIEHM u. FUDENBERG 1966	1158	200	99			RID
Eigene Untersuchungen	1001	195	87,2	286	26,6	RID

1470 mg/100 ml im Vergleich zu 1283 mg/100 ml der Gesamtimmunglobuline mit der radialen Immundiffusion.

Diskussion

Als Kriterien für die Beurteilung der Brauchbarkeit einer Proteinbestimmungsmethode haben vor allem die Spezifität sowie die Präzision und Reproduzierbarkeit der Methode zu gelten. Für klinische Belange, insbesondere, wenn Reihenuntersuchungen durchgeführt werden, sind auch der Arbeitsaufwand und die Kosten zu berücksichtigen.

Die Spezifität der Bestimmung eines Proteins durch radiale Immundiffusion in einem Antigengemisch ist abhängig von der Spezifität des verwendeten Antiserums. Je weniger das Antiserum mit anderen Proteinen des Gemisches reagiert, desto größer ist die Spezifität der Reaktion. Bei der Bestimmung der Immunglobuline durch Immunpräzipitation ergibt sich allerdings eine Einschränkung der Spezifität, die nicht zu umgehen ist. Alle bisher bekannten Immunglobuline sind aus je zwei identischen Polypeptidketten, den H- und L-Ketten, aufgebaut. Die Antigendeterminanten der L-Ketten sind bei allen Immunglobulinen gleich, während die Determinanten der H-Ketten für die einzelnen Immunglobuline typisch sind (30). Aus der identischen Reaktion der L-Ketten in allen Immunglobulinen resultiert die Antigenverwandtschaft der Immunglobuline. Dieses Phänomen schränkt zwangsläufig die Spezifität der immunologischen Bestimmung einzelner Immunglobuline in einem Gemisch ein.

Dennoch reicht die antigene Differenzierung der Immunglobuline aus, um sie in einem Gemisch mit ausreichender Genauigkeit immunologisch zu quantifizieren. Das geht auch aus unseren vergleichenden Bestimmungen von γ -G-Globulin im Serum und in reinen γ -G-Globulinlösungen hervor.

Die meisten der übrigen Serumproteine unterscheiden sich antigenetisch wesentlich mehr, so daß sie mit hoher Spezifität immunologisch bestimmt werden können, sofern das verwendete Antiserum monospezifisch ist.

Die durch wiederholten Ansatz von Standardserumverdünnungen festgestellte Reproduzierbarkeit der immunologischen Proteinbestimmung erwies sich als sehr gut. Die Streuung der Einzelwerte um die Mittelwerte war gering, die Korrelationen zwischen erwarteten und gefundenen Werten lagen alle über 0,996.

Fehlermöglichkeiten bei der quantitativen Proteinbestimmung durch Immundiffusion im antikörperhaltigen Agar ergeben sich aus verschiedenen Ursachen. Störungen der Diffusionsfähigkeit der Antigene durch Bildung von Molekül aggregaten führen zur Fehlbestimmung. Wichtig ist, daß der Zeitpunkt des Ausmessens der Präzipitatringe immer gleich gehalten wird, da sich die Ringdurchmesser auch nach 48 Std. noch verändern. Dieser Fehler läßt sich durch Mitführen von drei Standardserumverdünnungen zur Herstellung einer Eichkurve in jedem Plättchen reduzieren. Nicht selten sind die Ringe nicht ideal rund, vor allem bei hohen Antigenkonzentrationen. Bei geringen Abweichungen ist es zweckmäßig, den Mittelwert zweier, aufeinander senkrechter Durchmesser als Maß zu nehmen. Bei starken Abweichungen muß das Antigen in stärkerer Verdünnung erneut untersucht werden. Dem Ansetzen der Antigenverdünnung sollte viel Aufmerksamkeit geschenkt werden. Die Auftragsmenge muß ebenfalls sehr genau eingehalten werden. Das ist nur möglich bei Verwendung von Mikroliterpipetten.

Die von verschiedenen Autoren angegebenen Normbereiche bzw. Mittelwerte für einige Serumproteine zeigen gewisse Differenzen, die wohl überwiegend methodisch bedingt sind. Aber auch die mit einer Methode, hier der radialen Immundiffusion, in verschiedenen Laboratorien bestimmten Werte differieren. Neben den rein verfahrenstechnischen Unterschieden dürfte dafür vor allem die unterschiedliche Spezifität der verwendeten Antiseren und die Exaktheit der Einstellung der Referenzseren verantwortlich sein.

Die von uns ermittelten Werte stimmen am besten überein mit den von STIEHM und FUDENBERG (25) angegebenen Daten (Tab. 4), obwohl die Autoren ein anderes Inkubations- und Auswerteverfahren verwendeten.

Die quantitative Bestimmung von Proteinen durch radiale Immundiffusion stellt ein einfaches, empfindliches, ausreichend genaues und gut reproduzierbares Verfahren zur spezifischen Quantifizierung einzelner Proteine in Körperflüssigkeiten dar. Diese Methode bedeutet gegenüber der papierelektrophoretischen Gruppenanalyse von Proteingemischen eine wesent-

liche Bereicherung unserer diagnostischen Möglichkeiten.

Herrn OMR Priv.-Doz. Dr. BUBE, Leiter der Blutspendezentrale der Chirurg. Univ. Klinik Köln, danken wir für die Überlassung von Blutspendenserien.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für Sachbeihilfen.

Literatur

1. WUHRMANN, F. und H. MÄRKI, Dysproteinämien und Paraproteinämien. Schwabe u. Co, Basel, Stuttgart (1963). — 2. WAALER, E., Acta med. Scand. 17, 172 (1940). — 3. MIESCHER, P. und M. FAUCONNET, Experientia (Basel), 10, 252 (1954). — 4. ANDERSON, J. R., W. W. BUCHANAN, R. B. GONDIE und K. G. GRAY, J. Clin. Path. (London) 15, 462 (1962). — 5. SCHUMACHER, K., W. SCHNEIDER und R. GROSS, Ärztl. Lab. 13, 45 (1967). — 6. HEIDELBERGER, M. und F. E. KENDALL, J. Exper. Med. 55, 555 (1931). — 7. GOODMAN, M., D. S. RAMSEY, W. L. SIMPSON, D. G. REMP, D. H. BASINSKI und M. J. BRENNAN, J. Laborat. Clin. Med. S. Louis, 49, 151 (1957). — 8. HOIGNÉ, R., E. HUBER-STOLLER, G. GOLEY, F. RODRIGUEZ und H. ISLIKER, Schweiz. med. Wschr. 88, 331 (1958). — 9. SCHULTZE, H. E. und G. SCHWICK, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 4, 15 (1959). — 10. OUDIN, J., in A. C. CORCORAN, Methods in medical research. Vol. 5, S. 56 Year Book Publ. Chicago (1952). — 11. FEINBERG, J. G., Internat. Arch. Allergy, 11, 129 (1957). — 12. HAYWARD, B. J. und R. AUGUSTIN, Internat. Arch. Allergy 11, 192 (1957). — 13. MANCINI, G., J. P. VAERMAN, A. O. CARBONARA und J. F. HEREMANS, in H. Peeters: Proteins of the biological fluids. Elsevier Publ. Amsterdam (1964). — 14. OUCHTERLONY, O., Acta path. microbiol. Scand. 32, 231

- (1953). — 15. HITZIG, W. H., Internat. Arch. Allergy 19, 145 (1961). — 16. GOETTSCH, E. und F. E. KENDALL, J. biol. Chemistry 109, 221 (1935). — 17. MARKOWITZ, H., C. J. GUBLER, J. P. MAHONEY, G. E. CARTWRIGHT und M. M. WINTROBE, J. clin. Invest. 34, 1498 (1955). — 18. FROHMAN, C. E., M. GOODMAN, E. D. LUBY, P. G. S. BECKETT und R. SENF, Arch. Neurol. Psychiatr. (Chicago) 79, 730 (1958). — 19. ROTH, N., Ann. paediatr. Basel, 199, 548 (1962). — 20. WERDER-KIND, H., Helvet. paediatr. Acta 18, 450 (1963). — 21. HUNTLEY, C. C., Pediatrics (Springfield) 31, 123 (1963). — 22. FAHEY, J. L. und M. E. LAWRENCE, J. Immunol. (Baltimore) 91, 597 (1963). — 23. WEISS, W. A., Klin. Wschr. 43, 273 (1965). — 24. McKELVEY, E. M. und J. L. FAHEY, J. clin. Invest. 44, 1778 (1965). — 25. STIEHM, E. R. und H. H. FUDENBERG, Pediatrics (Springfield) 37, 715 (1966). — 26. HAFERKAMP, O., D. SCHLETTWEIN-GSELL, H. G. SCHWICK und K. STÖRIKO, Gerontologia 12, 30 (1966). — 27. RAVIN, R. A., Lancet (London) I 726 (1956). — 28. VELLA, F., Med. J. Malaya 12, 456 (1957). — 29. SASS-KORTSACK, A., M. CHERNIAK, D. W. GEIGER und R. J. SLATER, J. clin. Invest. 38, 1672 (1959). — 30. COHEN, S. und R. R. PORTER, Biochem. J. 90, 278 (1964).

Priv.-Doz. Dr. K. Schumacher
Medizinische Univ.-Klinik
5 Köln-Lindenthal

Haemoglobin Oxygen Saturation as determined by Interference Filter Photometry: Sources of Error¹⁾

By P. LUNDGAARD-HANSEN and U. SCHREIBER

From the Department of Surgical Research, University Department of Surgery, Inselspital, Berne, Switzerland

(Eingegangen am 13. Januar 1968)

For the measurement of haemoglobin oxygen saturation by interference filter photometry, two sources of error must be allowed for: first, the apparatus constants (D_R/D_G)_{HbO₂} and (D_R/D_G)_{Hb} differ for blood from various species. Second, the ratio $D_G(\text{HbO}_2/\text{Hb})$ may deviate significantly from 1.0; i. e. the green filter may not be isobestic. The accuracy of the method was assessed and the effects of both sources of error calculated. The agreement with the van Slyke method is good when these errors are eliminated. In the following paper, a nomogram is presented which can be adapted to the differences between species and filters.

Bei der Messung der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins mittels Interferenzfilterphotometrie sind zwei Fehlerquellen zu berücksichtigen: Erstens sind die Apparatekonstanten (D_R/D_G)_{HbO₂} und (D_R/D_G)_{Hb} von Spezies zu Spezies verschieden. Zweitens kann das Verhältnis $D_G(\text{HbO}_2/\text{Hb})$ von 1,0 signifikant differieren, d. h. das grüne Interferenzfilter nicht isobestisch sein. Die Genauigkeit der Methode wurde geprüft und die Auswirkungen der Fehlerquellen berechnet. Werden sie eliminiert, so ergibt sich eine gute Übereinstimmung mit der van Slyke-Methode. In der folgenden Arbeit wird ein Nomogramm vorgelegt, das den Variationen zwischen Spezies und Filtern angepaßt werden kann.

In clinical and laboratory work, the oxygen saturation of the blood frequently yields essential information. Its determination by manometric methods, although unsurpassed as to accuracy, consumes so much time that difficulties often arise with large sample numbers. For this reason, the more rapid photoelectric methods are widely used.

¹⁾ Work supported by Research Grant No. 4139 from the Swiss National Foundation for the Advancement of Scientific Research.

Reflection oximetry as inaugurated by ZIJLSTRA (1) has gained widespread acceptance. With this method, oxygen saturation in the higher range can be rapidly and accurately determined. According to ZIJLSTRA and VAN MOOK, however, it suffers from the disadvantage that it yields falsely high values for oxygen saturations less than 30 per cent (2). In our laboratory (3), and as also reported by COLE and HAWKINS (4), this systematic error is already present at higher saturation